



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Επιλογή σύζευξης θηλυκών της μύγας της Μεσογείου (Diptera: Tephritidae) που τρέφονται με πρωτεΐνη και ζάχαρη σε σχέση με τη μόλυνση των αρσενικών από τη *Wolbachia* και την έκθεσή τους σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού.

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Γεωργάκη Σωτηρία

Βόλος 2018

Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής  
και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

Ν. Θ. Παπαδόπουλος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Χ. Αθανασίου Καθηγητής (Μέλος)

Χ. Νάκας Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
SUMMARY.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1    Συστηματική κατάταξη-Γεωγραφική εξάπλωση .....	8
1.2    Σημασία-Ξενιστές .....	8
1.3    Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	9
1.4    Βιολογία.....	10
1.5    Αντιμετώπιση.....	11
1.6    Επίδραση των αιθέριων ελαίων στη σεξουαλική συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου.....	12
1.7 Το ενδοκυτταρικό βακτήριο <i>Wolbachia pipientis</i> .....	14
1.7.1 Γενικά στοιχεία .....	14
1.7.2 Μηχανισμοί διάδοσης.....	15
1.7.3 <i>Wolbachia</i> και Μύγα Μεσογείου .....	17
1.8 Επίδραση αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών στη συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου.....	17
1.9 Σκοπός της εργασίας.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21

2.1 Συνθήκες εργαστηρίου και μέθοδος εκτροφής των εντόμων.....	21
2.2 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς θηλυκά της αντίστοιχης φυλής.....	23
2.3 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς άγρια θηλυκά.....	25
2.4 Στατιστική ανάλυση.....	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	27
3.1 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς τα θηλυκά της αντίστοιχης φυλής.....	27
3.2 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς τα άγρια θηλυκά.....	29
3.3 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην καθυστέρηση της σύζευξης των αρσενικών ατόμων των εργαστηριακών φυλών με τα αντίστοιχα θηλυκά.....	32
3.4 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην καθυστέρηση της σύζευξης των αρσενικών ατόμων των εργαστηριακών φυλών με τα άγρια θηλυκά.....	33
3.5 Επίδραση των αιθέριων ελαίων πορτοκαλιού στην διάρκεια της σύζευξης των αρσενικών ατόμων των εργαστηριακών φυλών με τα θηλυκά των αντίστοιχων φυλών και των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών με τα θηλυκά των άγριων φυλών .....	35
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Νίκο Παπαδόπουλο για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία, για το ενδιαφέρον του και την πολύτιμη βοήθεια του. Θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στον κ. Χαράλαμπο Ιωάννου και στον κ. Γιώργο Κυρίτση για την υπομονή τους έως την διεκπεραίωση τόσο της πειραματικής διαδικασίας όσο και της συγγραφής της εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε σε συνθήκες εργαστηρίου ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $65\% \pm 5\%$  Σ.Υ., 14 ώρες φως : 10 ώρες σκότος) η επίδραση του ενδοκυτταρικού βακτηρίου *Wolbachia* και η έκθεση σε οσμές αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού στη σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών τριών εργαστηριακών φυλών της μύγας της Μεσογείου, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).

Οι φυλές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι: Μπενάκειο, 88.6 (Μπενάκειο μολυσμένη με το στέλεχος *wCer2* του *Wolbachia*) και S10.3 (Μπενάκειο μολυσμένη με το στέλεχος *wCer4* του *Wolbachia*). Σε μια πρώτη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της έκθεσης σε οσμές του αιθέριου ελαίου στα αρσενικά των παραπάνω φυλών για συζεύξεις με θηλυκά της αντίστοιχης φυλής. Στο δεύτερο κύκλο πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες φυλές και η ίδια πειραματική διαδικασία με τη διαφορά ότι τα θηλυκά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν άγρια (από φυσικά προσβεβλημένα μήλα της ποικιλίας Golden Delicious που συλλέχθηκαν από οπωρώνες της περιοχής της Αγιάς Λάρισας) τα οποία εκτράφηκαν για 10 και 11 γενεές στο εργαστήριο (F10 και F11). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Μάιο του 2016 έως τον Μάιο του 2017. Η πειραματική διαδικασία αφορούσε στην εκτροφή αρσενικών και θηλυκών ατόμων έως το στάδιο της ενηλικίωσής τους, έπειτα στην έκθεση των αρσενικών στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και τέλος στις δοκιμές των συζεύξεων. Σε κάθε πειραματικό κύκλο καταγράφονταν οι παρακάτω παράμετροι: α) η ώρα εισόδου των αρσενικών σε κάθε κλουβί, β) η κατηγορία του αρσενικού (εκτεθειμένο ή μη στις οσμές του αιθέριου ελαίου του πορτοκαλιού) που επιτύγχανε τη σύζευξη με το θηλυκό, γ) ο χρόνος που μεσολαβούσε από την είσοδο των αρσενικών μέχρι την έναρξη της σύζευξης και τέλος δ) η διάρκεια της κάθε σύζευξης.

Σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν στα συνολικά ποσοστά σύζευξης μεταξύ του πρώτου και δεύτερου κύκλου πειραμάτων. Συγκεκριμένα τα θηλυκά των εργαστηριακών φυλών συζευγνύονταν με τα αντίστοιχα αρσενικά (της ίδιας φυλής) σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα άγρια θηλυκά. Η έκθεση των αρσενικών της φυλής 88.6 στις οσμές του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού αύξησε την ανταγωνιστικότητα σύζευξής τους ως προς τα αντίστοιχα θηλυκά. Αύξηση της ανταγωνιστικότητας σύζευξης σημειώθηκε και για τα αρσενικά της φυλής S10.3 ως προς τα άγρια θηλυκά. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της έκθεσης στις οσμές του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού στη σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών.

## SUMMARY

We studied in laboratory conditions ( $25 \pm 2$  ° C,  $65\% \pm 5\%$  RH, 14 hours light: 10 hours dark) the effect of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis* and that of exposure to odor of orange essential oil on the mating competitiveness of three laboratory strains of the Mediterranean fly (medfly), *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).

The following medfly strains were used: Benakeio, 88.6 (Benakeio infected with the *Wolbachia* strain wCer2) and S10.3 (Benakeio infected with the *Wolbachia* strain wCer4). In a first series of experiments, the effect of exposure to odor of sweet orange essential oil on male mating competitiveness for females of the respective strain was studied. In a second set of experiments, the same lines and experimental procedure were used, except that the females used were wild (from field infected apples of the Golden Delicious variety harvested from orchards of the region of Agia Larissa), which were reared for 10 and 11 generations in the laboratory (F10 and F11). Experiments, were conducted in the Laboratory of Entomology and Agricultural Zoology, University of Thessaly, from May 2016 to May 2017. The experimental procedure involved rearing of males and females until the adult stage, then exposing males to sweet orange essential oil and finally, performing choice mating tests. The following parameters were recorded in each series of experiments: a) the time of entry of males in each cage, b) the status of males (exposed and non-exposed to orange essential oil) achieved copulations, c) the time lapsed from males' entry until copulation initiation and d) the duration of each mating. Significant differences were found regarding the total mating rates between the first and second set of experiments. Specifically, females of the laboratory strains were mated at higher rates than wilds. Male exposure to the odor of orange essential oil significantly increased their mating competitiveness in the case of 88.6 strain for the respective females. Increased mating competitiveness was also found for S10.3 males for wild



females. No significant effects of orange essential oil exposure were observed on males mating competitiveness in the other cases.

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Συστηματική κατάταξη-Γεωγραφική εξάπλωση

Η μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*) ανήκει στην οικογένεια Tephritidae της τάξης των διπτέρων (Diptera) και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Wiedemann το 1824. Η καταγωγή της αναφέρεται πως είναι από την τροπική Αφρική και συγκεκριμένα από τις υποσαχάριες περιοχές της ανατολικής Αφρικής (Κένυα και πιθανώς γειτονικές χώρες) απ' όπου μετέπειτα εξαπλώθηκε στην κεντρική και δυτική Αφρική. Από την Αφρική είτε μέσω της κοιλάδας του Νείλου είτε από τα παράλια της δυτικής Αφρικής εισήλθε στις ακτές της Μεσογείου και στη συνέχεια στην Αμερική, Αυστραλία, νησιά του Ινδικού, Ατλαντικού και Ειρηνικού ωκεανού (Παπαδόπουλος 2012, 2015). Η παρουσία του εντόμου στη χώρα μας αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1915 και έκτοτε έχει καταγραφεί η παρουσία του στις περισσότερες φρουτοπαραγωγικές περιοχές της ηπειρωτικής και νησιωτικής Ελλάδας (Παπαδόπουλος 2012).

### 1.2 Σημασία-Ξενιστές

Η μεγάλη οικονομική σημασία του εντόμου οφείλεται τόσο στην ευρεία γεωγραφική του εξάπλωση όσο και στο μεγάλο εύρος ξενιστών που προσβάλλει (περίπου 350 από τους οποίους το 40% ανήκει σε 5 οικογένειες: 6% Myrtaceae, 10% Rosaceae, 9% Rutaceae, 9% Sapotaceae, 6% Solanaceae). Στη χώρα μας προκαλεί σοβαρές ζημιές σε εσπεριδοειδή, αχλάδια, μήλα, ροδάκινα, βερίκοκα, σύκα και άλλα φρούτα (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Σε ορισμένες περιπτώσεις όπως στα ροδάκινα η προσβολή από τη μύγα της Μεσογείου μπορεί να εκμηδενίσει την παραγωγή (Παπαδόπουλος 2012).

### 1.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το ενήλικο έντομο έχει μήκος 4-6mm και πλάτος 1,2-2mm. Ο θώρακας του φέρει κηλίδες καστανού-κίτρινου χρώματος και οι πτέρυγες του είναι διαφανείς, με χαρακτηριστικές ζώνες επίσης καστανού-κίτρινου χρώματος και μήκος 4,5mm. Η κεφαλή έχει κιτρινωπό χρώμα ενώ οι κεραίες είναι καστανές-κόκκινες. Τα αρσενικά, σε αντίθεση με τα θηλυκά, έχουν επιπλέον 2 έμμοσχα ροπαλοειδή εξαρτήματα στο μπροστινό μέρος της κεφαλής. Τα θηλυκά έχουν ωοθήκη ο οποίος προεξέχει, είναι κιτρινέρυθρος και καστανός στην άκρη και έχει μήκος 0,9-1,3mm.

Το αυγό είναι μήκους 0,9-1,1mm διαμέτρου 0,2mm στενόμακρο, λείο, λευκό και καμπυλωτό. Η προνύμφη είναι ακέφαλη, άποδη λευκού-κίτρινου χρώματος, στενή στο πρόσθιο και παχιά στο οπίσθιο μέρος και το μήκος της είναι 7-9 και η διάμετρος 1,5-2mm.

Η νύμφη (pupa) είναι ανοιχτού καστανού χρώματος, ελλειψοειδής, διαστάσεων 4-4,5 X 2-2,5mm και συναντάται συνήθως στο έδαφος (Εικόνα 1, Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).



Εικόνα 1. Μύγα της Μεσογείου στο στάδιο της νύμφης (pupa)

#### 1.4. Βιολογία

Στην Ελλάδα, η μύγα της Μεσογείου έχει 3-7 γενεές το έτος (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003). Η διάρκεια ανάπτυξης των ανήλικων σταδίων κυμαίνεται από λίγες εβδομάδες έως μερικούς μήνες, η διάρκεια ζωής των ενηλίκων από ένα έως τρεις μήνες και εξαρτώνται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος (π.χ. θερμοκρασία, υγρασία), το είδος του ξενιστή, τη διαθεσιμότητα και ποιότητα της τροφής καθώς και το βιότυπο του εντόμου. Ο μέσος αριθμός αυγών που εναποθέτει κάθε θηλυκό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κυμαίνεται από 300-1000 (Παπαδόπουλος 2012). Το έντομο μπορεί να διαχειμάσει και ως ενήλικο σε ορισμένες περιοχές της χώρας με ήπιο χειμώνα όπως η Κρήτη. Μετά την εμφάνισή, τους τα ενήλικα, την άνοιξη ξεκινούν να τρέφονται με νέκταρ, μελιτώδη εκκρίματα κοκκοειδών ή με στερεά τροφή την οποία ρευστοποιούν με το σάλιο τους. Αφού τραφούν και ωριμάσουν αναπαραγωγικά ακολουθεί η σύζευξη και ωοτοκία κατά την οποία το θηλυκό διατρυπά με τον ωοθέτη του το εξωκάρπιο και μεσοκάρπιο των ώριμων ή ημιώριμων φρούτων και εναποθέτει τα αυγά (συνήθως 1 έως 10 αυγά ανά ωοτοκία ανάλογα με το είδος του καρπού) (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003, Παπαδόπουλος 2012). Παράλληλα, εξαιτίας της οπής ωοτοκίας ενδέχεται να αναπτυχθούν βακτηριακές ή μυκητιακές μολύνσεις καθώς και δευτερογενείς προσβολές από άλλα έντομα (π.χ. *Lamprolonchaea* spp., *Drosophila* spp., *Carpophilus* spp.) Σε ορισμένους καρπούς το νύγμα ωοτοκίας είναι εμφανές και περιβάλλεται από μια χλωρωτική κηλίδα. Η δεκτικότητα προσβολής από τη μύγα της Μεσογείου καθώς και η καταλληλότητα για την ανάπτυξη των προνυμφών της διαφέρει μεταξύ των ξενιστών (π.χ. από τα εσπεριδοειδή προτιμά τα νεράντζια και ακολούθως τα πορτοκάλια ενώ τα μανταρίνια αν και ευπαθής ξενιστής, αποφεύγουν την προσβολή, καθώς καθίστανται δεκτικά προσβολής στις αρχές του χειμώνα όταν το έντομο είναι λιγότερο δραστήριο (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

## 1.5 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση της μύγας της Μεσογείου στη χώρα μας βασίζεται κυρίως σε χημικούς ψεκασμούς, κάλυψης ή δολωματικούς. Στους δολωματικούς χρησιμοποιείται, εκτός του εντομοκτόνου, ελκυστικό υγρό το οποίο είναι διάλυμα υδρολυμένης πρωτεΐνης. Για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην εφαρμογή των ψεκασμών αλλά και για τον χρονικό προσδιορισμό αυτών γίνεται παρακολούθηση της παρουσίας του εντόμου με παγίδες, διαφορετικά ακολουθείται ημερολογιακό πρόγραμμα ψεκασμών (αναλόγως την εποχή, την περιοχή και το είδος του δέντρου). Οι κυριότεροι τύποι παγίδων που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση ή μαζική παγίδευση του πληθυσμού της μύγας της Μεσογείου είναι οι εξής: α) παγίδες τύπου McPhail οι οποίες περιέχουν υδρολυμένη πρωτεΐνη με βόρακα ή συνδυασμό ουσιών (οξικό αμμώνιο, 1,4-διαμινοβουτάνιο και τριμεθυλαμίνη) που είναι πιο αποτελεσματικός για την προσέλκυση των θηλυκών ατόμων, β) παγίδες τύπου Jackson με την παραφερομόνη trimedlure που είναι πολύ ισχυρό ελκυστικό για τα αρσενικά (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος 2003).

Άλλος τρόπος καταπολέμησης του εντόμου, που όμως προϋποθέτει την εφαρμογή του στο σύνολο των οπωρώνων μιας ευρύτερης περιοχής (εφαρμογή σε περιφερειακό ή ακόμη και διασυνοριακό επίπεδο) είναι η εξαπόλυση στείρων αρσενικών (Sterile Insect Technique, SIT). Η σύλληψη της ιδέας για εξαπόλυση στείρων εντόμων έγινε μεταξύ των δεκαετιών του 1930 και 1940 από τρεις επιστήμονες διαφορετικών επιστημονικών ενδιαφερόντων, τον A. S. Serebrovskii , τον F. L. Vanderplan και τον E. F. Knipling. Παρ' όλα αυτά , μόνο μετά το 1950 η SIT αναγνωρίστηκε ως η πιο επιτυχημένη τεχνική προκαλώντας στείρωση με τη χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας (Muller 1950) και εντάχθηκε σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης. Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου έγινε στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής για την καταπολέμηση του παράσιτου των ζώων *Cochliomyia hominivorax* (Dyck et al. 2005). Επιπλέον η SIT χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την καταπολέμηση των δίπτερων της οικογένειας Tephritidae σε πολλές χώρες ιδιαίτερα μετά την αναχαίτηση της εισόδου της

μύγας της Μεσογείου από την κεντρική Αμερική στο νότιο Μεξικό, κατά την δεκαετία του 1970.

Για την αντιμετώπιση των πληθυσμών του *C. capitata*, εξαπολύονται μέχρι και σήμερα στείρωμένα αρσενικά των φυλών Vienna 7 GSS και Vienna 8 GSS. Τα έντομα των φυλών αυτών φέρουν 2 γενετικές μεταλλάξεις (tsl και wr) που επιτρέπουν την εξαπόλυση μόνο αρσενικών ατόμων. Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη wr="white pupae" αναφέρεται στη χρωματική διαφορά που παρουσιάζουν οι νύμφες όπου οι θηλυκές είναι λευκές και οι αρσενικές καστανές, ενώ η μετάλλαξη tsl="thermal sensitive lethal" αφορά στην αντοχή που παρουσιάζουν τα αρσενικά άτομα έναντι των θηλυκών σε ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών με αποτέλεσμα μετά την έκθεσή τους σε αυτό να επιβιώνουν μόνο τα αρσενικά. Η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται από την ικανότητα των εξαποληθέντων-στειωμένων αρσενικών να συζευχθούν με τα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού μειώνοντας το αναπαραγωγικό δυναμικό τους. Η στείρωση των εντόμων επιτυγχάνεται κυρίως με τη χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας (Kyritsis 2016).

Τέλος τα καλλιεργητικά μέτρα αντιμετώπισης του εντόμου περιλαμβάνουν την συλλογή και καταστροφή προσβεβλημένων καρπών καθώς και την καταστροφή μη καλλιεργούμενων άγριων ξενιστών και πρέπει να εντάσσονται σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης του εντόμου (Παπαδόπουλος 2012).

#### 1.6 Σεξουαλική συμπεριφορά και συμπεριφορά ωτοκίας

Τα αρσενικά της μύγας της Μεσογείου δημιουργούν χαρακτηριστικές συναθροίσεις στην κάτω επιφάνεια των φύλλων των φυτών ξενιστών, γνωστές σαν "leks" και στη συνέχεια εκδηλώνουν σεξουαλικό κάλεσμα εκλύοντας σεξουαλική φερομόνη με στόχο την προσέλκυση των θηλυκών (Εικόνα 2) (Eberhard, 2000; Sivinski et al., 2000; Yuval & Hendrichs, 2000).



Εικόνα 2. Ενήλικο αρσενικό της Μύγας της Μεσογείου που εκδηλώνει σεξουαλικό κάλεσμα

Τα θηλυκά προσελκύονται στα “leks” και μετά από μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία ερωτοτροπίας επιλέγουν το σεξουαλικό τους σύντροφο. Η συμπεριφορά ερωτοτροπίας ξεκινά αμέσως μόλις ένα αρσενικό προσεγγίσει το θηλυκό και συνήθως περιλαμβάνει ταχύ ανέμισμα των πτερύγων, κίνηση της κεφαλής, συστροφή της κοιλίας και παραγωγή ήχων (Briceno & Eberhard, 2000; Prokopy & Hendrichs, 1979). Στη συνέχεια το αρσενικό επιχειρεί να ανέβει στη ράχη του θηλυκού και εφόσον γίνει αποδεκτό αρχίζει η σύζευξη που διαρκεί κατά μέσο όρο 2 με 3 ώρες (Εικόνα 3) (Whittier et al., 1992) και οδηγεί στη μεταφορά σπέρματος στις σπερμοθήκες του θηλυκού (Yuval et al., 1996).



Εικόνα 3. Ζευγάρι αρσενικού και θηλυκού ατόμου της μύγας της Μεσογείου

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της συμπεριφοράς των συζευγμένων θηλυκών είναι η αυξημένη προσέλκυσή τους τις οσμές των καρπών-ξενιστών προκειμένου να ωοτοκήσουν, σε αντίθεση με τα μη-συζευγμένα θηλυκά τα οποία προσελκύονται περισσότερο από τη σεξουαλική φερομόνη των αρσενικών προκειμένου να συζευχθούν. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή της θέσης ωοτοκίας είναι το χρώμα, το σχήμα, το μέγεθος του καρπού, η πίεση ωοτοκίας, οι οσμές του καρπού, η «μνήμη» του εντόμου για ένα συγκεκριμένο καρπό στον οποίο έχει ωοτοκήσει στο παρελθόν και οι αποτρεπτικές για την ωοτοκία οσμές (ενδεικτικές της ακαταλληλότητας-ανωριμότητας ενός καρπού ή της προσβολής από άλλα έντομα) (Παπαναστασίου, 2014; Ιωάννου, 2014).

## 1.7 Το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Wolbachia pipientis*

### 1.7.1 Γενικά

Το *Wolbachia pipientis* είναι ένα υποχρεωτικώς ενδοκυτταρικό παράσιτο που ανήκει στην α-υποομάδα των πρωτεοβακτηρίων της οικογένειας Rickettsiaceae. Το *Wolbachia* προσβάλλει μεγάλο ποσοστό αρθροπόδων, πάνω από το 16% των εντόμων, καθώς και ισόποδα, ακάρεα, νηματώδεις. Το *Wolbachia* είναι μητρικώς κληρονομούμενο και μεταφέρεται στους απογόνους με κάθετη μεταφορά μέσω του κυτταροπλάσματος των αυγών. Η πρώτη αναφορά παρουσίας του βακτηρίου έγινε το 1924 από τους Hertig και Wolbach σε ωοθήκες του κουνουπιού *Culex pipiens*. Κατά τη διάρκεια του 1950 διαπιστώθηκε η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Cytoplasmic Incompatibility, CI) μετά από συζεύξεις μεταξύ κουνουπιών *Culex pipiens* οι οποίες έδιναν λίγους έως καθόλου απογόνους από τους Ghelelovitch και Laven όμως μόνο μετά το 1970 αποσαφηνίστηκε ότι η CI οφείλεται στην παρουσία του *Wolbachia* (Yen & Barr, 1971) ύστερα από πειράματα με χρήση αντιβιοτικών (Werren, 1997).

### 1.7.2 Μηχανισμοί διάδοσης

Για να εξασφαλίσει την 'κάθετη' μεταφορά, το βακτήριο χρησιμοποιεί κάποιες στρατηγικές που παρεμβαίνουν στην αναπαραγωγή των ξενιστών οι οποίες είναι (i) η θηλυκοποίηση, (ii) η θηλυτόκος παρθενογένεση, (iii) η θανάτωση των αρσενικών εμβρύων και (iv) η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility CI).

#### (i) Θηλυκοποίηση

Πρόκειται για ένα μηχανισμό μετατροπής μολυσμένου αρσενικού απογόνου σε πλήρως λειτουργικό θηλυκό μέσω της καταστολής ενός ανδρογόνου αδένα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν διάφορα καρκινοειδή (Crustacea) όπως το *Armadillidium vulgare* της τάξης των ισόποδων. Η ύπαρξη του παράγοντα θηλυκοποίησης (*Wolbachia*) μπορεί να αποσταθεροποιήσει τον καθορισμένο μηχανισμό διαμόρφωσης του φύλου και επιπλέον να προκαλέσει την συσσώρευση γονιδίων-καταστολέων του αρσενικού φύλου σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό (Werren, 1997).

#### (ii) Θηλυτόκος παρθενογένεση

Αυτός ο μηχανισμός περιλαμβάνει τη δημιουργία θηλυκών απογόνων από μη γονιμοποιημένα ωάρια με την προϋπόθεση ότι σ' αυτά υπάρχει το βακτήριο *Wolbachia* το οποίο επιδρά στην ανάφαση στην πρώτη μιτωτική διαίρεση με αποτέλεσμα το αυγό να οδηγείται στην δημιουργία διπλοειδούς από απλοειδή πυρήνα. Με βάση το φαινόμενο της αρρενοτοκίας, εάν δεν υπήρχε το βακτήριο στα θηλυκά αγονιμοποίητα αυγά τότε θα προκύπταν αρσενικοί απόγονοι (απλοειδής πυρήνας).

#### (iii) Θανάτωση των αρσενικών εμβρύων

Αυτός ο τύπος διάδοσης του βακτηρίου είναι ο πιο σπάνιος και παρατηρείται σε περιπτώσεις όπου υπάρχει αυξημένος ανταγωνισμός για τους διαθέσιμους πόρους. Η θανάτωση



αρσενικών εμβρύων θα επέλθει μετά από σύζευξη μολυσμένων θηλυκών με μη μολυσμένα αρσενικά για τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν. Έως σήμερα έχουν βρεθεί ότι παρουσιάζουν αυτόν τον φαινότυπο 4 διαφορετικές τάξεις αρθροπόδων: τα Diptera, Coleoptera, Lepidoptera από την κλάση των εντόμων και από την κλάση Arachnida, η τάξη των Pseudoscorpiones.

#### (iv) Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Cytoplasmic Incompatibility CI)

Ο τελευταίος τρόπος διάδοσης(CI) είναι ο πιο κοινός και εκφράζεται μέσω της θανάτωσης των εμβρύων που έχουν προέλθει είτε από συζεύξεις μεταξύ μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά είτε από συζεύξεις μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων διαφορετικής μολυσματικής κατάστασης, δηλαδή άτομα μολυσμένα με διαφορετικά βακτηριακά στελέχη. Έχουν προταθεί δύο βιοχημικά μοντέλα προκειμένου να εξηγήσουν τον μηχανισμό δράσης της CI. Στο πρώτο, το βακτήριο στο αρσενικό δρα παράγοντας ένα προϊόν που διακόπτει την διαδικασία της εξέλιξης του σπέρματος μέσα στο αυγό ενώ στο δεύτερο μοντέλο, το βακτήριο στο αρσενικό δρα 'απορροφώντας' ένα προϊόν απαραίτητο για την φυσιολογική πορεία εξέλιξης του σπέρματος στο αυγό. Ο ακριβής τρόπος έκφρασης της CI καθώς και η δράση του *Wolbachia* παρ' όλα αυτά, δεν είναι πλήρως κατανοητοί και επηρεάζονται από ένα πλήθος παραγόντων όπως του τύπου του βακτηριακού στελέχους, του γενοτύπου του ξενιστή και την βακτηριακή πυκνότητα. Κοινό σημείο όμως των όσων έχουν αναφερθεί φαίνεται να είναι η τροποποίηση των πατρικών χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης (Werren, 1997).

Η παραπάνω στρατηγική μετάδοσης αποτελεί εργαλείο για την τεχνική ασύμβατου εντόμου IIT (Incompatible Insect Technique), μεθόδου ανάλογης της SIT, κατά την οποία γίνεται μαζική εξαπόλυση αρσενικών μολυσμένων από το *Wolbachia*, εντόμων με αποτέλεσμα την σύζευξη τους με τους φυσικούς πληθυσμούς θηλυκών και κατ' επέκταση την θανάτωση των απογόνων

στο εμβρυικό στάδιο. Στην περίπτωση εξαπόλυσης μολυσμένων θηλυκών, η μέθοδος IIT δεν θα είχε τα άμεσα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς θα επιτυγχάνονταν απλώς η πληθυσμιακή αύξηση των ατόμων που θα έφεραν το βακτήριο (Zabalou, 2009).

### 1.7.3 *Wolbachia* και μύγα της Μεσογείου

Το *C. capitata*, αποδείχθηκε ως μη φυσικός ξενιστής του βακτηρίου *Wolbachia* ύστερα από εκτεταμένες μελέτες που έγιναν (Bourtzis, 1994), παρόλο που ορισμένες επιστημονικές ομάδες είχαν διαπιστώσει το αντίθετο σε κάποιους φυσικούς πληθυσμούς στην Βραζιλία και την Τυνησία (Rocha 2005). Οι Zabalou et al. το 2004 κατάφεραν να μολύνουν τεχνητά τη μύγα της Μεσογείου της φυλής Μπενάκειο χρησιμοποιώντας ως δότη το *Rhagoletis cerasi* προκαλώντας πλήρη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σε διασταυρώσεις μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά. Στη συνέχεια η ίδια ομάδα επιχείρησε την μόλυνση με την φυλή 88.6 ως δότη (μολυσμένη με το βακτηριακό στέλεχος wCer2) στον πληθυσμό Vienna 8 GSS με εξίσου επιτυχή αποτελέσματα (Zabalou et al., 2009) δημιουργώντας κατ' αυτό τον τρόπο τις βάσεις για την εφαρμογή της τεχνικής ασύμβατου εντόμου (IIT).

### 1.8 Επίδραση αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών στη συμπεριφορά της μύγας της Μεσογείου

Όπως έχει αναφερθεί ανωτέρω, η αναπαραγωγική επιτυχία των πολυγαμικών αρσενικών ατόμων της μύγας της Μεσογείου βασίζεται στη δημιουργία των leks (Prokopy and Hendrichs, 1979; Hendrichs et al., 1991). Οι θέσεις στη κόμη των δέντρων όπου αναπτύσσονται τα «leks» συμπεριλαμβάνουν την ύπαρξη πυκνού φυλλώματος, τον επαρκή φωτισμό και θερμοκρασία καθώς και άλλα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντα χώρου σε συνδυασμό με την οσμή του ξενιστή που μπορεί να χρησιμεύσει ως το αρχικό ερέθισμα για την προσέλκυση των αρσενικών (Hendrichs et al., 1991; Kaspi and Yuval, 1999). Τα εσπεριδοειδή φαίνεται να έχουν όλες αυτές τις ιδιότητες, όπως έχει διαπιστωθεί από παρατηρήσεις αγρού, ώστε να εξυπηρετούν την αρχική δημιουργία των περιοχών lek για τα αρσενικά (Hendrichs and

Hendrichs, 1990; Hendrichs et al., 1991). Παρόλο που οι τρόποι εγκαθίδρυσης των leks παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι εικάζεται ότι η οσμή από τα εσπεριδοειδή (ή εκείνη άλλων κατάλληλων ξενιστών) προσελκύει τους «ιδρυτές» (αρχικά αρσενικά άτομα) των leks. Στη συνέχεια άλλα αρσενικά άτομα μπορούν να προσελκυσθούν από την παραγόμενη φερομόνη και να «ενταχθούν» (Hendrichs and Hendrichs, 1990; Shelly and Villalobos, 2004) σε υπάρχουσες συναθροίσεις. Τα αρσενικά της μύγας της Μεσογείου ελκύονται επίσης και από τη συνθετική ουσία trimedlure, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στη εγκαθίδρυση των “leks” (Beroza et al., 1961; Shelly et al., 1993; Katsoyannos et al., 1997). Ισχυρή έλξη αρσενικών αλλά όχι θηλυκών ατόμων προκύπτει από την οσμή των πληγωμένων στον φλοιό (flavedo) καρπών εσπεριδοειδών, ιδιαίτερα των πορτοκαλιών, όπως έχει αποδειχθεί από τον Katsoyannos και συνεργάτες (1997). Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ισχυρή έλξη επίσης από τα αρσενικά σε αιθήρια έλαια εσπεριδοειδών. Συγκεκριμένες ενώσεις, όπως το *a-copaene* που είναι κοινό συστατικό στοιχείο πολλών αιθέριων ελαίων το οποίο όμως βρίσκεται σε μικρά ποσοστά στα αιθήρια έλαια εσπεριδοειδών, προκαλεί ισχυρή προσέλκυση αρσενικών και συμβάλει στη δημιουργία των συναθροίσεων τύπου ‘leks’ (Nishida et al., 2000). Ανεξαρτήτως όμως από τη σημαντικότητα του *a-copaene*, φαίνεται ότι τα αιθήρια έλαια εσπεριδοειδών προάγουν την εγκαθίδρυση των leks.

Σε συνέχεια των ερευνών των Katsoyannos et al. (1997), αποδείχθηκε λίγα χρόνια αργότερα πως τα αιθήρια έλαια εσπεριδοειδών ενισχύουν την αναπαραγωγική επιτυχία των αρσενικών ατόμων της μύγας της Μεσογείου (Paradopoulos et al. 2001a). Πράγματι, αρσενικά εκτεθειμένα είτε σε φυσικά είτε σε εμπορικά έλαια εσπεριδοειδών συζευγνύονταν σε μεγαλύτερα ποσοστά σε σχέση με μη εκτεθειμένα άτομα. Παράλληλα μια άλλη ομάδα εργαζόμενη ανεξάρτητα, έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με το έλαιο της ρίζας του φυτού τζίντζερ (Shelly, 2001). Έκθεση των αρσενικών στις οσμές των φύλλων εσπεριδοειδών που δεν έφεραν καρπούς επέφεραν παραπλήσιες επιδράσεις για τα αρσενικά της μύγας της Μεσογείου (Shelly et al., 2004). Παρόλο που αρχικά πιστευόταν πως το *a-copaene* ήταν το

υπεύθυνο χημικό συστατικό τόσο των εσπεριδοειδών όσο και των ριζών του φυτού τζίντζερ, που αύξανε την επιτυχία στις συζεύξεις των αρσενικών (αν και σε μικρές ποσότητες στα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών) πρόσφατα αποδείχθηκε πως μείγμα ουσιών διαφορετικών του *a-copaene* μπορούν να προκαλέσουν το ίδιο φαινόμενο (Kouloussis et al., 2013). Συγκεκριμένα, αρσενικά που εκτέθηκαν σε μείγμα λιμονένιου, λιναλούλης, γερανιόλης, *α-pinene* και *b-myrcene* σε αναλογία 1:1:1:1:1, πέτυχαν αναλογία συζεύξεων 3:1 όταν ανταγωνίζονταν τα μη εκτεθειμένα αρσενικά. Αν και κρίνεται απαραίτητο να γίνουν εκτενέστερες μελέτες, έχει αποδειχθεί πως η ουσία λιναλούλη αυξάνει σημαντικά τη σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των εκτεθειμένων σε αυτή αρσενικών ενώ παράλληλα το λιμονένιο (το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού) μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα συστατικά είναι υπεύθυνο για την αύξηση της συζευκτικής επιτυχίας των εκτεθειμένων σε αυτό αρσενικών (Papadopoulos et al., 2015).

Παρ' όλες τις μελέτες που έχουν γίνει, οι φυσιολογικοί και συμπεριφορικοί μηχανισμοί που αφορούν τα αυξημένα ποσοστά σύζευξης των εκτεθειμένων αρσενικών σε αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών, παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Η κατάποση των υπεύθυνων χημικών και η χρήση τους στη σύνθεση της σεξουαλικής φερομόνης καθώς επίσης και η αλληλεπίδραση των πτητικών ελαίων εσπεριδοειδών με επίδραση στην επιδερμική οσμή, έχει προταθεί ως πιθανό ενδεχόμενο για τις αυξημένες επιδόσεις σύζευξης (Papadopoulos et al., 2006; Shelly et al., 2007). Αρσενικά εκτεθειμένα σε έλαια εσπεριδοειδών παρουσιάζουν σε υψηλότερα ποσοστά το σεξουαλικό κάλεσμα απ' ότι τα μη εκτεθειμένα άτομα. Παράλληλα, τα παρθένα θηλυκά άτομα ελκύονται περισσότερο από την σεξουαλική φερομόνη των εκτεθειμένων αρσενικών, αφιερώνοντας πιο πολύ χρόνο σε αυτά λόγω της συγκεκριμένης οσμής, με αποτέλεσμα την ολοκληρωμένη εκδήλωση του σεξουαλικού καλέσματος (Papadopoulos et al., 2006).

## 1.9 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του ενδοκυτταρικού βακτηρίου *Wolbachia pipientis* και των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών ατόμων της μύγας της Μεσογείου που τρέφονταν με ζάχαρη και πρωτεΐνη. Η τεχνητή μόλυνση της μύγας της Μεσογείου της φυλής Μπενάκειο με τα στελέχη wCer2 και wCer4 του ενδοκυτταρικού βακτηρίου *Wolbachia pipientis* (Zabalou et al., 2004) έθεσε τις βάσεις για την εφαρμογή της τεχνικής του ασύμβατου εντόμου (IIT) ως μεθόδου βιολογικής καταπολέμησης όπως αναφέρεται παραπάνω. Η επιτυχία όμως της μεθόδου αυτής όπως και άλλων παραπλήσιων μεθόδων εξαπόλυσης στερημένων εντόμων εξαρτάται από την ικανότητα των μολυσμένων (εξαπολυόμενων) αρσενικών να ανταγωνίζονται τα αρσενικά των φυσικών πληθυσμών (Τζανακάκης 1995). Τα αποτελέσματα της εργασίας μπορούν να συμβάλουν στην αντιμετώπιση του εχθρού αυτού μέσω της αποτελεσματικότερης εφαρμογής της τεχνικής του ασύμβατου εντόμου (IIT).

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συνθήκες εργαστηρίου και μέθοδος εκτροφής των εντόμων

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Μάιο του 2016 έως τον Μάιο του 2017 σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), σχετικής υγρασίας ( $65\% \pm 5\%$ ) και φωτοπεριόδου (14 ώρες φως : 10 ώρες σκότος). Ο φωτισμός προερχόταν τόσο από λάμπες φθορίου όσο και από φυσικό φως που εισέρχονταν από 4 μεγάλα παράθυρα στο εσωτερικό του χώρου.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εργαστηριακές φυλές της μύγας της Μεσογείου: α) Μπενάκειο, β) 88:6 (μολυσμένη με το βακτηριακό στέλεχος wCer2 της *Wolbachia*) και γ) S-103 (μολυσμένη με το βακτηριακό στέλεχος wCer4 της *Wolbachia*). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και άγρια έντομα της F<sub>10</sub>-F<sub>11</sub> γενιάς που προήλθαν από προσβεβλημένα μήλα της ποικιλίας Golden Delicious που συλλέχθηκαν από οπωρώνες της περιοχής Αγιά Λάρισας. Η διατήρηση των ενηλίκων γινόταν σε ξύλινα κλουβιά διαστάσεων 30x30x30 cm που είχαν τις τρεις πλευρές τους καλυμμένες με πλαστικό πλέγμα και τη μια με γυαλί (Εικόνα 4). Σε κάθε κλουβί τοποθετούνταν 500-600 άτομα και των δύο φύλων, νερό σε πλαστικά φιαλίδια με φιτίλι και τροφή ενηλίκων. Η τροφή των ενηλίκων αποτελούνταν από μίγμα υδρολυμένης πρωτεΐνης (INC Biomedicals Inc., Irvine, CA), ζάχαρης και νερού σε αναλογία 1:4:5 και προσφερόταν στα έντομα με τη μορφή στερεοποιημένων σταγόνων στην επιφάνεια πλαστικών τρυβλίων Petri διαμέτρου 9 cm. Για την ωτοκία τοποθετούνταν εντός των κλουβιών κοίλα πλαστικά ημισφαίρια κόκκινου χρώματος τα οποία έφεραν περίπου 100 οπές διαμέτρου ενός χιλιοστού ('domes') (Εικόνα 5). Τα 'domes' εφάρμοζαν σε τρυβλία petri τα οποία τοποθετούνταν στη βάση τους που περιείχε νερό για να διατηρείται η υγρασία στα επιθυμητά, για την εκδήλωση ωτοκίας, επίπεδα. Τα αυγά μεταφέρονταν με τη βοήθεια μαλακού πινέλου από το εσωτερικό των domes όπου είχαν αποθεθεί, σε θρεπτικό υπόστρωμα για την εκκόλαψη και ανάπτυξη των προνυμφών. Το υπόστρωμα αποτελούνταν από δίσκους βάμβακος διαμέτρου 5 cm εμποτισμένους με κατάλληλη τεχνητή τροφή (Boller

1985). Οι δίσκοι με την τροφή των προνυμφών τοποθετούνταν μέσα σε γυάλινα τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm τα οποία είχαν αποστειρωθεί προηγουμένως με καθαρό οινόπνευμα.



Εικόνα 4. Κλουβί εκτροφής ενηλίκων της μύγας της Μεσογείου



Εικόνα 5. Τεχνητό υπόστρωμα ωτοκίας (dome)

Η ανάπτυξη των προνυμφών στο θρεπτικό υπόστρωμα, στις συνθήκες του εργαστηρίου (25 °C), ολοκληρωνόταν σε 7-8 ημέρες. Λίγο πριν την ολοκλήρωση της ανάπτυξης, τα τρυβλία ανοίγονταν και τοποθετούνταν επάνω σε ένα στρώμα στεγνής άμμου πάχους 4-5 mm μέσα σε πλαστικές λεκάνες. Οι ανεπτυγμένες προνύμφες εξέρχονταν από τα τρυβλία και νυμφώνονταν στην άμμο. Δύο έως τρεις ημέρες μετά τη νύμφωση, η άμμος απομακρυνόταν με κοσκίνισμα και οι νύμφες τοποθετούνταν σε πλαστικά τρυβλία Petri. Η έξοδος των ενηλίκων λάμβανε χώρα 9-10 ημέρες μετά τη νύμφωση.

## 2.2 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς θηλυκά της αντίστοιχης φυλής.

Με την έναρξη εξόδου των ενηλίκων από το στάδιο της νύμφης, 120 θηλυκά μεταφέρονταν με τη βοήθεια αναρροφητικής συσκευής (aspirator) σε δύο κλουβιά Plexiglas 20x20x20 cm που περιείχαν νερό και πλήρη τροφή ενηλίκων (ζάχαρη & πρωτεΐνη). Δύο ημέρες αργότερα μεμονωμένα θηλυκά μεταφέρονταν σε 100 διαφανή ατομικά κλουβιά κατασκευασμένα από ποτήρια χωρητικότητας 400 ml που επίσης περιείχαν τροφή ενηλίκων. Για τον καλύτερο αερισμό σε κάθε κλουβί υπήρχε πλευρικά ένα άνοιγμα (5 x 8 cm) το οποίο καλύπτονταν με λεπτή μουσελίνα. Η βάση του κάθε κλουβιού έφερε το κάλυμμα ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 9 cm. Τα κλουβιά ήταν τοποθετημένα σε βάσεις τρυβλίων Petri διαμέτρου 9 cm που περιείχαν νερό στο οποίο τα θηλυκά είχαν πρόσβαση για να πίνουν μέσω ενός μικρού φιτιλιού (Εικόνα 6).





Εικόνα 6. Ατομικό κλουβί

Αντίστοιχα, με την έναρξη εξόδου των ενηλίκων, 280 αρσενικά μεταφέρονταν σε 4 κλουβιά Plexiglas 20x20x20 cm (70 αρσενικά σε κάθε κλουβί) με νερό και πλήρη τροφή ενηλίκων (ζάχαρη & πρωτεΐνη). Την επόμενη ημέρα τα αρσενικά επιμερίζονταν σε δύο κατηγορίες (μάρτυρας και μεταχείριση) και επισημαίνονταν στο θώρακα με διαφορετικά υδατοδιαλυτά, μη τοξικά χρώματα (λευκό και κόκκινο) ώστε να μπορούν να διακρίνονται μεταξύ τους. Τέσσερις ημέρες μετά την έξοδο των αρσενικών, στα δύο κλουβιά από Plexiglas της μεταχείρισης τοποθετούνταν δύο κοίλα, πλαστικά ημισφαίρια κόκκινου χρώματος τα οποία έφεραν 100 οπές διαμέτρου δύο χιλιοστών έκαστο. Στο εσωτερικό του κάθε ημισφαιρίου τοποθετούνταν ένα πλαστικό, κυλινδρικό δοχείο που έφερε 4 στρώσεις διηθητικού χαρτιού που εφάρμοζαν στον πυθμένα του. Με τη βοήθεια μιας πιπέτας ακριβείας εφαρμόζονταν 20  $\mu$ L αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού επί των στρώσεων του διηθητικού χαρτιού ενώ στη βάση του τρυβλίου που εφάρμοζαν τα ημισφαίρια προθέτονταν και περίπου 3 ml νερού. Η ίδια ακριβώς διαδικασία εφαρμόζονταν και στα κλουβιά του μάρτυρα με τη διαφορά ότι δεν γινόταν η προσθήκη των αιθέριων ελαίων. Προκειμένου να μην υπάρξει επαφή του μάρτυρα

με τις οσμές του ελαίου του πορτοκαλιού, κάθε φορά η έκθεση των αρσενικών της μεταχείρισης λάμβανε χώρα σε ξεχωριστό χώρο (δωμάτιο). Την επόμενη ημέρα (5<sup>η</sup>) γινόταν ανανέωση των ποσοτήτων του αιθέριου ελαίου του πορτοκαλιού στα κλουβιά της μεταχείρισης. Την έκτη ημέρα, με την έναρξη της φωτόφασης (07:00 πμ) ένα αρσενικό από τη μεταχείριση και ένα από το μάρτυρα μεταφέρονταν σε καθένα από τα 100 ατομικά κλουβιά προκειμένου να συζευχθούν με τα παρθένα θηλυκά που υπήρχαν σε αυτά. Σε κάθε περίπτωση καταγράφονταν η ώρα εισόδου των αρσενικών σε κάθε κλουβί, η κατηγορία του αρσενικού (μεταχείριση ή μάρτυρας) που επιτύγχανε τη σύζευξη με το θηλυκό, ο χρόνος που μεσολαβούσε από την είσοδο των αρσενικών μέχρι την έναρξη της σύζευξης και τέλος η διάρκεια της κάθε σύζευξης.

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε και για τις τρεις εργαστηριακές φυλές (Μπενάκειο, 88:6 και S10.3) που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

### 2.3 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς άγρια θηλυκά.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια ακριβώς με την παραπάνω με τη μόνη διαφορά ότι τα άγρια θηλυκά που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές σύζευξης ήταν ηλικίας 12-14 ημερών. Η διαφοροποίηση κρίθηκε απαραίτητη εξαιτίας του γεγονότος ότι τα άγρια θηλυκά της μύγας της Μεσογείου απαιτούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τις εργαστηριακές φυλές προκειμένου να ωριμάσουν αναπαραγωγικά και συνεπώς να είναι δεκτικά για σύζευξη.

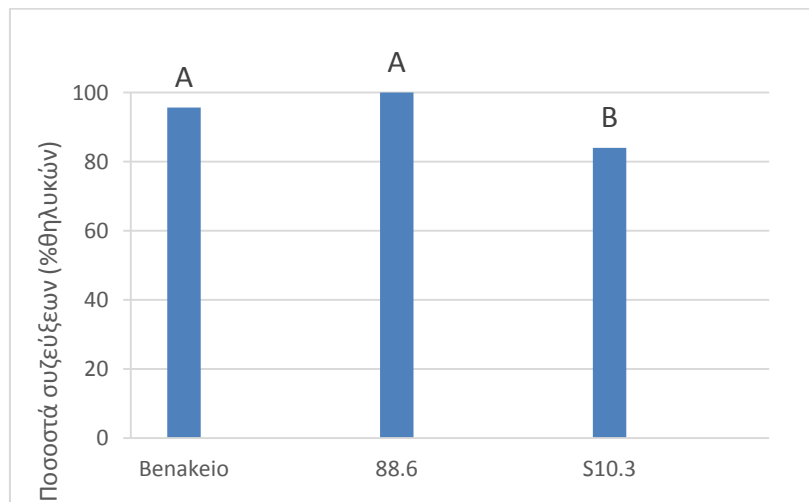
### 2.4 Στατιστική ανάλυση

Οι συγκρίσεις που αφορούσαν τα ποσοστά σύζευξης των αρσενικών με τα θηλυκά πραγματοποιήθηκαν με το  $\chi^2$  κριτήριο. Οι συγκρίσεις που αφορούσαν το χρόνο μέχρι την έναρξη της σύζευξης καθώς επίσης και τη διάρκεια της σύζευξης μεταξύ των αρσενικών που είχαν εκτεθεί στα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού και του μάρτυρα (μη εκτεθειμένα αρσενικά) πραγματοποιήθηκαν με το  $t$ -κριτήριο. Οι αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics Ver. 20. Σε όλες τις περιπτώσεις ή πιθανότητα λάθους ορίστηκε στο  $\alpha = 0.05$ .

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

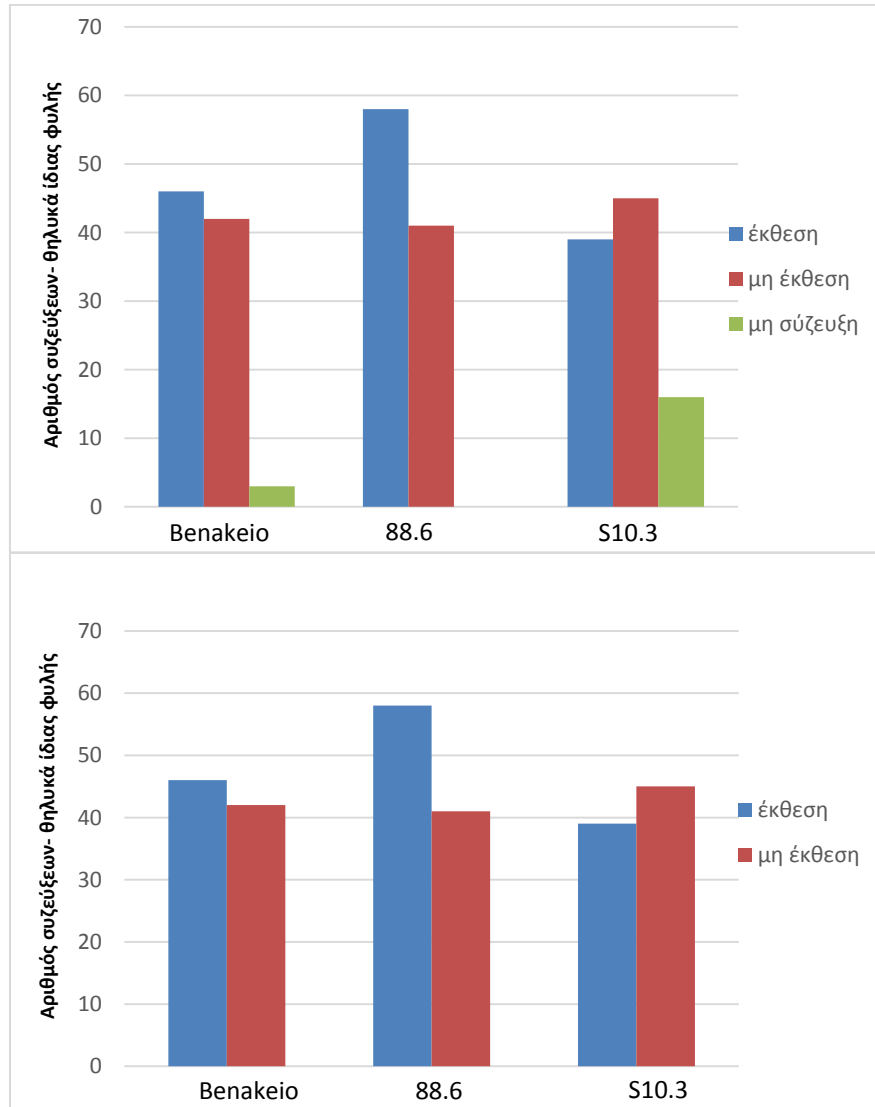
3.1 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών για θηλυκά της αντίστοιχης φυλής.

Τα ποσοστά σύζευξης των αρσενικών με τα αντίστοιχα θηλυκά της φυλής τους κυμάνθηκαν από 84% για τη φυλή S10.3 έως 100% για την 88.6 και διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Pearson Chi-square  $\chi^2=21,238$ ,  $df=2$ ,  $P=0,001$ ) μετά από εφαρμογή της διόρθωσης κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις). Ειδικότερα τα αρσενικά της φυλής S10.3 πέτυχαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό συζεύξεων με τα αντίστοιχα θηλυκά τους σε σχέση με τα αρσενικά της φυλής Μπενάκειο (Pearson Chi-square  $\chi^2=6,972$ ,  $df=1$ ,  $P=0,008$ ) και σε σχέση με τα αρσενικά της φυλής 88.6 (Pearson Chi-square  $\chi^2=17,225$ ,  $df=1$ ,  $P=0,001$ ). Οι συγκρίσεις μεταξύ των ποσοστών σύζευξης των αρσενικών της φυλής Μπενάκειο και των αρσενικών της φυλής 88.6 με τα αντίστοιχα θηλυκά έδειξαν ότι δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά (Pearson Chi-square  $\chi^2=4,396$ ,  $df=1$ ,  $P=0,036$ ) (Διάγραμμα 1).



**Διάγραμμα 1.** Ποσοστά συζεύξεων της μύγας της Μεσογείου που προέρχονταν από τις τρεις εργαστηριακές φυλές ανεξάρτητα από την έκθεση ή μη του αρσενικού σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού. Ποσοστά που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά ( $P=0,017$  μετά από εφαρμογή της διόρθωσης κατά Bonferroni 0.05/ $n$  όπου  $n$  ο αριθμός των μεταχειρίσεων μεταξύ των οποίων γίνονται οι συγκρίσεις,  $\chi^2$  κριτήριο).

Η έκθεση στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού δεν αύξησε την ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών της φυλής Μπενάκειο (Pearson Chi-square  $\chi^2=0,277$ ,  $df=1$ ,  $P=0,598$ ). Παραπλήσια ήταν τα αποτελέσματα για τα αρσενικά άτομα της φυλής S10.3 (Pearson Chi-square  $\chi^2= 1,329$ ,  $df=1$ ,  $P=0,249$ ). Αντιθέτως στα αρσενικά άτομα της φυλής 88.6 η έκθεση στο αιθέριο έλαιο φαίνεται να αυξάνει την ανταγωνιστικότητα σύζευξης (Pearson Chi-square  $\chi^2= 5,838$ ,  $df=1$ ,  $P=0,016$ ) (Διάγραμμα 2).

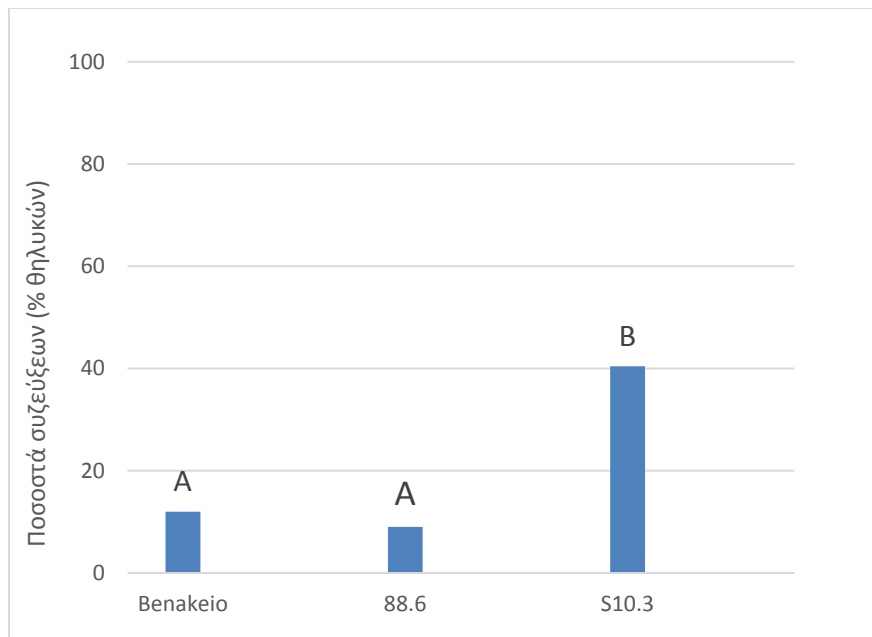


**Διάγραμμα 2.** Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού και της μόλυνσης με *Wolbachia* στο ποσοστό των συζεύξεων των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών με τα θηλυκά των αντίστοιχων φυλών. Το άνω διάγραμμα δείχνει τον αριθμό των συζεύξεων των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών που εκτέθηκαν σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και

εκείνων που δεν εκτέθηκαν καθώς επίσης δείχνει και τον αριθμό εκείνων που δεν συζεύχθηκαν καθόλου ενώ το κάτω διάγραμμα δείχνει μόνο τον αριθμό των συζεύξεων των αρσενικών που εκτέθηκαν και δεν εκτέθηκαν σε αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού.

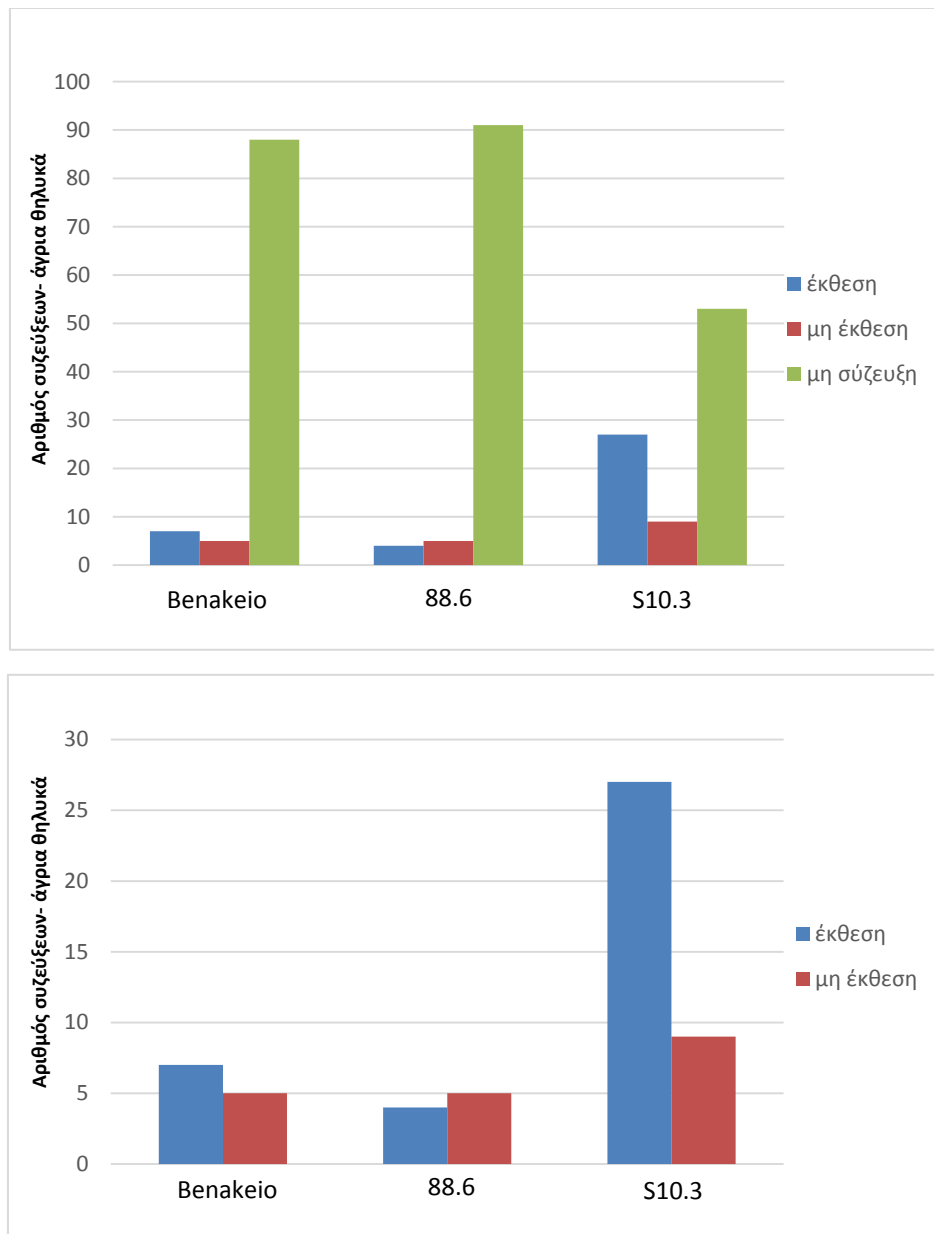
3.2 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών προς τα άγρια θηλυκά.

Τα ποσοστά των συζεύξεων μεταξύ των αρσενικών ατόμων των εργαστηριακών φυλών και των θηλυκών ατόμων των άγριων φυλών διέφεραν σημαντικά (Pearson Chi-square  $\chi^2 = 35,177$ ,  $df=2$ ,  $P=0,001$ ; Διάγραμμα 3). Οι αριθμοί των συζεύξεων μεταξύ των αρσενικών της φυλής Μπενάκειο και των θηλυκών της άγριας φυλής σε σχέση με τα ποσοστά σύζευξης μεταξύ των αρσενικών ατόμων της φυλής 88.6 και των θηλυκών της άγριας φυλής δεν διέφεραν σημαντικά (Pearson Chi-square  $\chi^2 = 0,479$ ,  $df=1$ ,  $P=0,489$ ). Η φυλή 88.6 σε σύγκριση με τη φυλή S10.3 (Pearson Chi-square  $\chi^2 = 25,675$ ,  $df=1$ ,  $P=0,001$ ) καθώς επίσης και η φυλή Μπενάκειο σε σύγκριση με τη φυλή S10.3 (Pearson Chi-square  $\chi^2 = 20,116$ ,  $df=1$ ,  $P=0,001$ ) έδειξαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά σύζευξης.



**Διάγραμμα 3.** Ποσοστά συζεύξεων της μύγας της Μεσογείου που προέρχονταν από τις τρεις εργαστηριακές φυλές (αρσενικά άτομα) και από τους φυσικούς πληθυσμούς γενεών F10 και F11 (θηλυκά άτομα) ανεξάρτητα από την έκθεση ή μη του αρσενικού σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού. Ποσοστά που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά ( $P=0,017$  μετά από εφαρμογή της διόρθωσης κατά Bonferroni  $0.05/n$  όπου  $n$  ο αριθμός των μεταχειρίσεων μεταξύ των οποίων γίνονται οι συγκρίσεις,  $\chi^2$  κριτήριο).

Η έκθεση στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού δεν φαίνεται να αυξάνει την ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών όταν χρησιμοποιήθηκαν άγρια θηλυκά τόσο στα αρσενικά της φυλής Μπενάκειο όσο και στα αρσενικά της φυλής 88.6 (Pearson Chi-square  $\chi^2=0,667$ ,  $df=1$ ,  $P=0,414$  και  $\chi^2=0,222$ ,  $df=1$  και  $P=0,637$  αντίστοιχα). Στα αρσενικά άτομα της φυλής S10.3 η έκθεση στο αιθέριο έλαιο φαίνεται ότι επιδρά στην αύξηση της συζευκτικής τους ανταγωνιστικότητας προς τα άγρια θηλυκά (Pearson Chi-square  $\chi^2=18,000$ ,  $df=1$ ,  $P=0,001$ ) (Διάγραμμα 4).



**Διάγραμμα 4.** Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού και της μόλυνσης με *Wolbachia* στον αριθμό των συζεύξεων των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών με τα θηλυκά των άγριων φυλών. Το άνω διάγραμμα δείχνει τον αριθμό των συζεύξεων των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών που εκτέθηκαν σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και εκείνων που δεν εκτέθηκαν καθώς επίσης δείχνει και τον αριθμό εκείνων που δεν συζεύχθηκαν καθόλου ενώ το κάτω διάγραμμα δείχνει μόνο τον αριθμό των συζεύξεων των αρσενικών που εκτέθηκαν και δεν εκτέθηκαν σε αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού.



3.3 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην υστέρηση (χρόνο έως τη σύζευξη) σύζευξης των αρσενικών ατόμων των εργαστηριακών φυλών με τα αντίστοιχα θηλυκά.

Τα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού δεν φαίνεται να επηρεάζουν την υστέρηση σύζευξης των αρσενικών όταν τα θηλυκά είναι της ίδιας εργαστηριακής φυλής (Μπενάκειο, 88.6, S10.3) καθώς οι διαφορές μεταξύ των συγκρίσεων των χρόνων υστέρησης των αρσενικών εκτεθειμένων και μη εκτεθειμένων δεν ήταν σημαντικές (independent t-test,  $P > 0,05$ ) (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1.** Μέση διάρκεια της υστέρησης σύζευξης αρσενικών των τριών εργαστηριακών φυλών της μύγας της Μεσογείου τα οποία είχαν εκτεθεί σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και ανταγωνίζονται μη εκτεθειμένα αρσενικά της ίδιας φυλής. Σε όλες τις περιπτώσεις τα θηλυκά ήταν της ίδιας φυλής. Η σύγκριση των χρόνων υστέρησης έγινε με το κριτήριο t .

Συνδυασμοί σύζευξης		Αριθμός συζεύξεων σε 100 δοκιμές	Υστέρηση στη σύζευξη  (λεπτά της ώρας $\pm$ TA)	Κριτήριο- t	P
Φυλή θηλυκών	Φυλή αρσενικών και έκθεση στο αιθέριο έλαιο	#			
Benakeio	Benakeio εκτεθειμένα	46	34,89 $\pm$ 9,58	-0,448	0,655
	Benakeio μη εκτεθειμένα	42	40,59 $\pm$ 8,21		
88.6	88.6 εκτεθειμένα	58	19,88 $\pm$ 4,33	0,581	0,562
	88.6 μη εκτεθειμένα	41	22,93 $\pm$ 3,18		
S10.3	S10.3 εκτεθειμένα	39	61,00 $\pm$ 8,62	-0,031	0,975
	S10.3 μη εκτεθειμένα	45	60,59 $\pm$ 9,93		

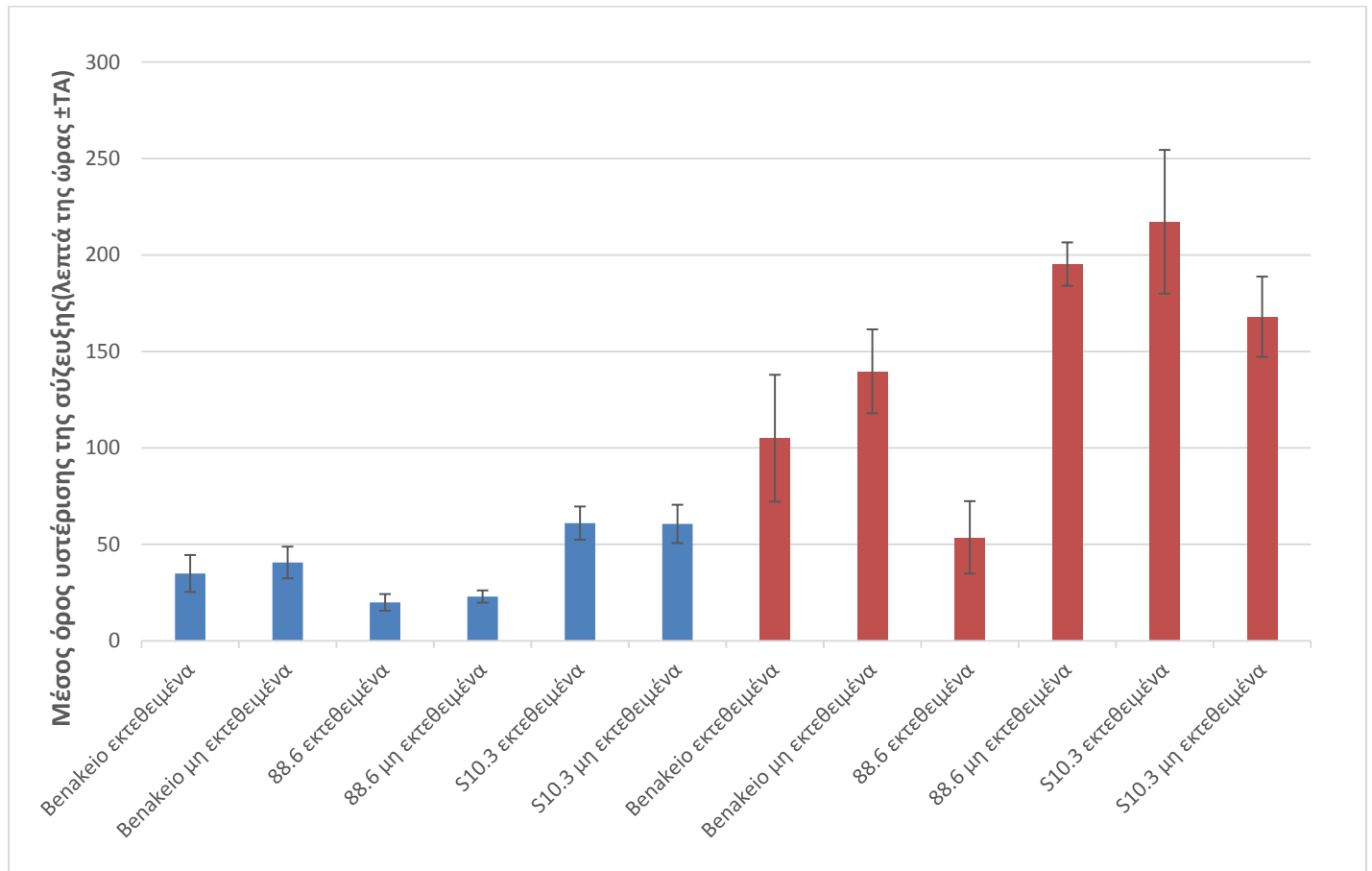
### 3.4 Επίδραση των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού στην καθυστέρηση της σύζευξης των αρσενικών ατόμων των εργαστηριακών φυλών με τα άγρια θηλυκά.

Οι διαφορές μεταξύ των εκτεθειμένων και μη εκτεθειμένων αρσενικών ως προς την καθυστέρηση στη σύζευξη με τα άγρια θηλυκά δεν ήταν στατιστικά σημαντικές όταν τα αρσενικά άτομα ανήκαν στις φυλές Μπενάκειο και S10.3 ( $P>0,05$ ). Αντιθέτως, τα αρσενικά εκτεθειμένα και μη εκτεθειμένα άτομα της φυλής 88.6 παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς την υστέρηση στη σύζευξη με τα άγρια θηλυκά ( $P<0,05$ ) (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Μέση διάρκεια της υστέρησης σύζευξης αρσενικών των τριών εργαστηριακών φυλών της μύγας της Μεσογείου τα οποία είχαν εκτεθεί σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και ανταγωνίζονται μη εκτεθειμένα αρσενικά της ίδιας φυλής. Σε όλες τις περιπτώσεις τα θηλυκά ήταν άγριας φυλής. Η σύγκριση των χρόνων υστέρησης έγινε με το κριτήριο  $t$ .

Συνδυασμοί σύζευξης		Αριθμός συζεύξεων σε 100 δοκιμές	Υστέρηση σύζευξης  (λεπτά της ώρας $\pm$ TA)	$t$	$P$
Φυλή θηλυκών	Φυλή αρσενικών και έκθεση στο αιθέριο έλαιο	#			
Άγρια	Βενακειο εκτεθειμένα	7	105,00 $\pm$ 2,88	0,921	0,379
	Βενακειο μη εκτεθειμένα	5	139,71 $\pm$ 1,72		
Άγρια	88.6 εκτεθειμένα	4	<b>53,60 <math>\pm</math>18,78</b>	6,033	<b>0,001</b>
	88.6 μη εκτεθειμένα	5	<b>195,25<math>\pm</math>11,26</b>		
Άγρια	S10.3 εκτεθειμένα	27	217,22 $\pm$ 37,26	-1,174	0,249
	S10.3 μη εκτεθειμένα	9	167,96 $\pm$ 20,82		

Στο Διάγραμμα 5 δίνονται οι χρόνοι υστέρησης σύζευξης για όλες τις κατηγορίες των συζεύξεων και για τα δύο πειράματα. Όπως αναμενόταν οι χρόνοι έως τη σύζευξη ήταν πολύ μικρότεροι για τα εργαστηριακά θηλυκά σε σχέση με τα άγρια. Δε φαίνεται να υπάρχει σαφής επίδραση της φυλής του αρσενικού και της έκθεση στο αιθέριο έλαιο στο χρόνο έως τη σύζευξη.



**Διάγραμμα 5.** Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* και της έκθεσης σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού στην υστέρηση σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών όταν συζευγνύονται με θηλυκά της ίδιας φυλής (μπλε χρώμα) και άγρια θηλυκά (κόκκινο χρώμα).

3.5 Επίδραση των αιθέριων ελαίων πορτοκαλιού στην διάρκεια της σύζευξης των αρσενικών ατόμων των εργαστηριακών φυλών με τα θηλυκά των αντίστοιχων φυλών και των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών με τα θηλυκά των άγριων φυλών.

Όπως προκύπτει από όλες τις περιπτώσεις, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην διάρκεια της σύζευξης μεταξύ των εκτεθειμένων και των μη εκτεθειμένων αρσενικών με τα θηλυκά που ανήκαν στην ίδια εργαστηριακή φυλή καθώς και μεταξύ των εκτεθειμένων και των μη εκτεθειμένων αρσενικών των εργαστηριακών φυλών με τα θηλυκά των άγριων φυλών (independent t-test,  $P > 0,05$ ) (Πίνακας 3, Πίνακας 4, Διάγραμμα 6).

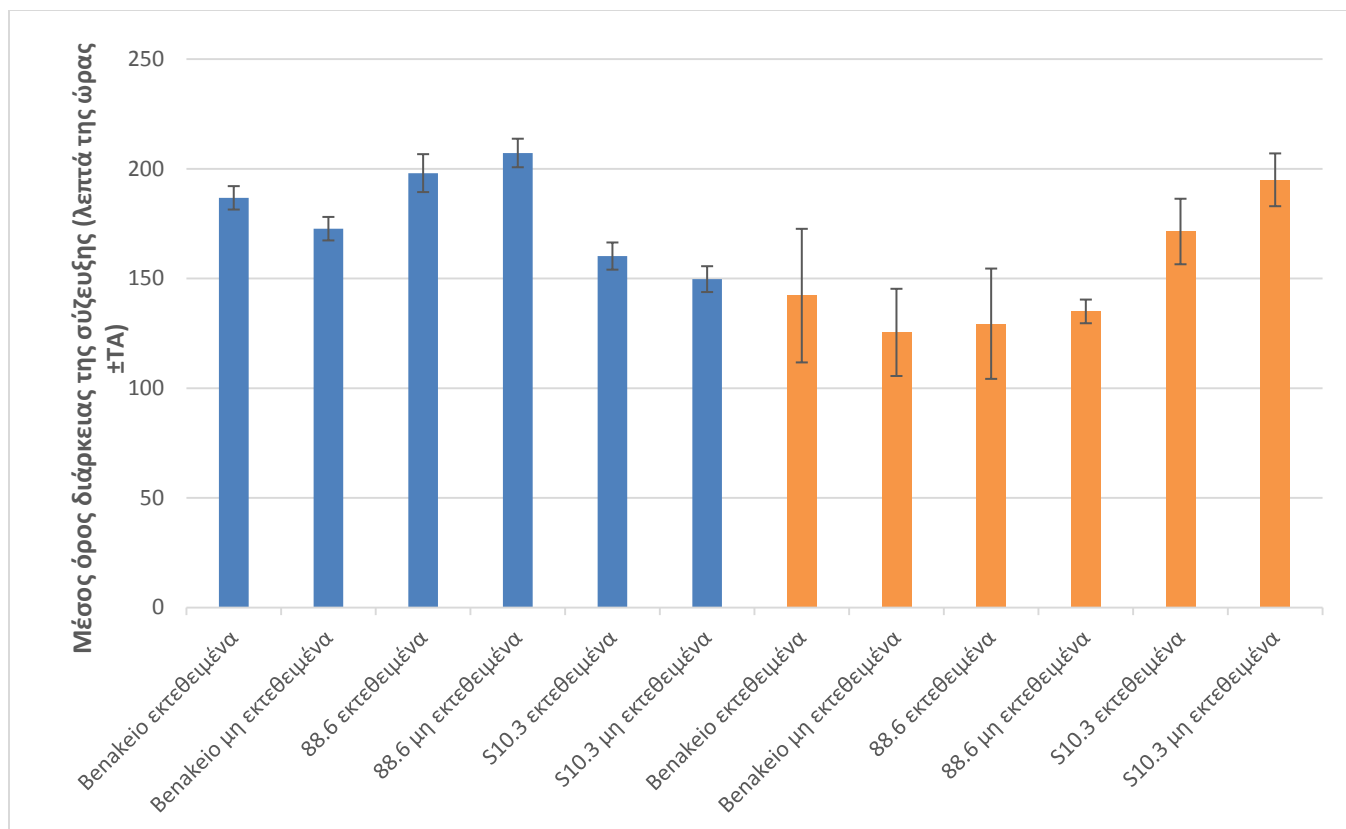
**Πίνακας 3.** Μέση διάρκεια της σύζευξης αρσενικών των τριών εργαστηριακών φυλών της μύγας της Μεσογείου τα οποία είχαν εκτεθεί σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και ανταγωνίζονται μη εκτεθειμένα αρσενικά της ίδιας φυλής. Σε όλες τις περιπτώσεις τα θηλυκά ήταν της ίδιας φυλής. Η σύγκριση των χρόνων υστέρησης έγινε με το κριτήριο t .

Συνδυασμοί σύζευξης		Αριθμός συζεύξεων σε 100 δοκιμές	Διάρκεια σύζευξης  (λεπτά της ώρας $\pm$ TA)	t	P
Φυλή θηλυκών	Φυλή αρσενικών και έκθεση στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού	#			
Benakeio	Benakeio εκτεθειμένα	46	186,79 $\pm$ 5,33	-1,858	,067
	Benakeio μη εκτεθειμένα	42	172,72 $\pm$ 5,35		
88.6	88.6 εκτεθειμένα	58	198,05 $\pm$ 8,64	0,866	0,389
	88.6 μη εκτεθειμένα	41	207,24 $\pm$ 6,51		
S10.3	S10.3 εκτεθειμένα	39	160,24 $\pm$ 6,19	-1,221	0,226

S10.3 μη εκτεθειμένα	45	149,72 ± 5,89		
-------------------------	----	---------------	--	--

**Πίνακας 4.** Μέση διάρκεια της σύζευξης αρσενικών των τριών εργαστηριακών φυλών της μύγας της Μεσογείου τα οποία είχαν εκτεθεί σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού και ανταγωνίζονται μη εκτεθειμένα αρσενικά της ίδιας φυλής. Σε όλες τις περιπτώσεις τα θηλυκά ήταν άγριας φυλής. Η σύγκριση των χρόνων υστέρησης έγινε με το κριτήριο t.

Συνδυασμοί σύζευξης		Αριθμός συζεύξεων σε 100 δοκιμές	Διάρκεια της σύζευξης  (λεπτά της ώρας ±TA)	Κριτήριο- t	P
Φυλή θηλυκών	Φυλή αρσενικών και έκθεση στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού	#			
Άγρια	Βενακείο εκτεθειμένα	7	142,20 ± 30,45	-0,483	0,639
	Βενακείο μη εκτεθειμένα	5	125,43 ± 19,88		
Άγρια	88.6 εκτεθειμένα	4	129,4 ± 25,15	0,194	0,852
	88.6 μη εκτεθειμένα	5	135,00 ± 5,40		
Άγρια	S10.3 εκτεθειμένα	27	171,44 ± 14,93	1,039	0,306
	S10.3 μη εκτεθειμένα	9	195,00 ± 12,04		



**Διάγραμμα 6.** Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* και της έκθεσης σε αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού στην διάρκεια της σύζευξης των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών όταν συζευγνύονται με θηλυκά της ίδιας φυλής (μπλε χρώμα) και άγρια θηλυκά (πορτοκαλί χρώμα).

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα ανωτέρω αποτελέσματα προκύπτει ότι:

α) ο αριθμός των συζεύξεων μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών που ανήκαν στην ίδια εργαστηριακή φυλή υπερείχε του αριθμού των συζεύξεων μεταξύ των αρσενικών των εργαστηριακών φυλών και των θηλυκών της άγριας φυλής.

β) στα έντομα της φυλής S10.3 παρατηρήθηκαν μικρότερα ποσοστά σύζευξης σε σύγκριση με τα έντομα των φυλών Μπενάκειο και 88.6 στην περίπτωση όπου τα θηλυκά ανήκαν στις αντίστοιχες φυλές, ενώ παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά σύζευξης σε σύγκριση με τα έντομα των φυλών Μπενάκειο και 88.6 όταν τα θηλυκά ανήκαν σε άγρια φυλή. Αυτό καταδεικνύει πως τα αρσενικά έντομα της φυλής S10.3 είναι περισσότερο αποδεκτά από τα άγρια θηλυκά προς σύζευξη έναντι των αρσενικών των υπόλοιπων δυο φυλών.

γ) τα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού δεν έδρασαν αυξάνοντας την σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών των φυλών Μπενάκειο και S10.3 όταν τα θηλυκά ανήκαν στις αντίστοιχες φυλές, ενώ λειτούργησαν αντίθετα για τα αρσενικά της 88.6 φυλής όταν επίσης τα θηλυκά ανήκαν στην αντίστοιχη φυλή.

δ) τα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού αύξησαν την σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών της φυλής S10.3 όταν τα θηλυκά ανήκαν σε άγρια φυλή σε σύγκριση με τα αρσενικά των υπόλοιπων δυο φυλών όταν επίσης τα θηλυκά ανήκαν σε άγρια φυλή.

ε) η έκθεση στα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού δεν επηρέαζε τον χρόνο υστέρησης της σύζευξης σε καμία από τις περιπτώσεις όπου τα αρσενικά ανήκαν στις φυλές Μπενάκειο, S10.3 και 88.6 και τα θηλυκά ανήκαν στις αντίστοιχες φυλές.

ζ) η έκθεση στα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού όταν τα θηλυκά ανήκαν σε άγρια φυλή μείωνε τον χρόνο υστέρησης της σύζευξης των εκτεθειμένων σε αυτά αρσενικών 88.6 σε

σύγκριση με των μη εκτεθειμένων σε αυτά, αρσενικών της 88.6 φυλής. Για τις άλλες δυο φυλές ο χρόνος υστέρησης δεν επηρεάστηκε από την έκθεση στο αιθέριο έλαιο.

η) η έκθεση στα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού καθώς και η μολυσματική κατάσταση των εντόμων δεν επηρέασε την διάρκεια στη σύζευξη μεταξύ των εκτεθειμένων και των μη εκτεθειμένων σε αυτά, αρσενικών εντόμων με τα θηλυκά της αντίστοιχης φυλής και με τα θηλυκά άγριας φυλής.

Επισημαίνεται ότι, παρουσιάστηκε σημαντική σχέση στη μέση διάρκεια υστέρησης της σύζευξης (latency) των εκτεθειμένων από των μη εκτεθειμένων στα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού αρσενικών της 88.6 φυλής σε συνάρτηση με τα άγρια θηλυκά. Υπήρξε σημαντική μείωση στη χρονική διάρκεια υστέρησης της σύζευξης στην παρουσία των αιθέριων ελαίων ( $P < 0,05$ ). Συμπεραίνεται επομένως ότι τα άγρια θηλυκά τείνουν να ξεκινήσουν την σύζευξη με τα εκτεθειμένα παρά με τα μη εκτεθειμένα αρσενικά της 88.6 φυλής ακριβώς λόγω της παρουσίας των αιθέριων ελαίων του πορτοκαλιού.

Επίσης σημαντική σχέση παρουσιάστηκε ανάμεσα στα αρσενικά άτομα της φυλής S10.3 και στα θηλυκά των φυσικών πληθυσμών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Πραγματοποιήθηκαν περισσότερες συζεύξεις σε σύγκριση με τα αρσενικά των υπόλοιπων δυο φυλών συμπεραίνοντας ότι τα άγρια θηλυκά είναι περισσότερο δεκτικά στη σύζευξη με τα αρσενικά της συγκεκριμένης φυλής. Επίσης στα αρσενικά άτομα της S10.3 φυλής η έκθεση στο αιθέριο έλαιο αύξησε κατά πολύ την σεξουαλική τους ανταγωνιστικότητα σε σύγκριση με τα μη εκτεθειμένα άτομα της ίδιας φυλής ( $P = 0,001 < 0,017$ ) ενώ παράλληλα τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού δεν επηρέασαν την ανταγωνιστικότητα των αρσενικών των υπολοίπων δυο εργαστηριακών φυλών ( $P > 0,017$ ).

Συνολικά τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα εργαστηριακά αρσενικά, ανεξάρτητα από τη μόλυνση με *Wolbachia*, που τρέφονταν με ζάχαρη και πρωτεΐνη δεν ανταποκρίνονταν



αποτελεσματικά στην έκθεση στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν αντίστοιχα πειράματα που διεξήχθησαν σε παράλληλο χώρο και χρόνο με τη μόνη διαφορά ότι τα εργαστηριακά αρσενικά τρέφονταν μόνο με ζάχαρη, απουσία πρωτεΐνης (Κουμινιώτακη 2018). Αντιθέτως, άγρια αρσενικά που εκτίθενται σε αιθέρια έλαια πορτοκαλιού αποκτούν πλεονέκτημα σύζευξης όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Paradopoulos et al. 2001).

Η μόλυνση με *Wolbachia* επηρεάζει σημαντικά την ανταγωνιστικότητα σύζευξης των αρσενικών με διαφορετικό τρόπο για τις διαφορετικές φυλές του βακτηρίου. Συγκεκριμένα η φυλή S10.3 (μολυσμένη με το βακτηριακό στέλεχος *wCer4*) φαίνεται ότι έχει θετική επίδραση και αυξάνει την ανταγωνιστικότητα σύζευξης προς τα άγρια θηλυκά, ενώ η 88.6 (μολυσμένη με το βακτηριακό στέλεχος *wCer2*) δεν επηρεάζει την ανταγωνιστικότητα των αρσενικών προς τα άγρια θηλυκά. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκε σε πρόσφατη μελέτη ο Κυρίτσης (2016 Διδακτορική διατριβή).

Εκ των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν εκείνα που αφορούν στις συζεύξεις των αρσενικών της εργαστηριακής φυλής S10.3 με τα θηλυκά του άγριου πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα το ενδιαφέρον εστιάζεται στα αρσενικά της φυλής S10.3 που είχαν εκτεθεί στις οσμές του αιθέριου ελαίου του πορτοκαλιού πραγματοποιώντας συζεύξεις σε μεγαλύτερα ποσοστά έναντι των αρσενικών, εκτεθειμένων και μη, των υπολοίπων δυο εργαστηριακών φυλών. Επίσης, από παλαιότερες μελέτες των Katsoyannos et al. (1997) και Paradopoulos et al. (2001) έχει αποδειχθεί πως τα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών αυξάνουν την αναπαραγωγική επιτυχία των αρσενικών της μύγας της Μεσογείου ενώ παράλληλα η κατάποση των υπεύθυνων χημικών των αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών και η χρήση τους στη σύνθεση της σεξουαλικής φερομόνης έχει προταθεί ως πιθανό ενδεχόμενο για τις αυξημένες επιδόσεις σύζευξης (Paradopoulos et al., 2006; Shelly et al., 2007). Σε πειράματα που έλαβαν χώρα αργότερα στο εργαστήριο εντομολογίας και γεωργικής ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Τσιούφης, 2010 Πτυχιακή διατριβή) αποδείχθηκε πως η προσθήκη αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού στη διατροφή των αρσενικών της μύγας της Μεσογείου αύξησε την ανταγωνιστικότητα σύζευξής τους. Επομένως

προτείνεται η εκτενέστερη μελέτη των παραπάνω αποτελεσμάτων με πειράματα για τα αρσενικά της εργαστηριακής φυλής S10.3 και της αλληλεπίδρασης τους με τα θηλυκά των φυσικών πληθυσμών στην σεξουαλική ανταγωνιστικότητα έπειτα από την κατάποση των υπεύθυνων χημικών του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Briceno, RD, Ramos D, Eberhard WG, 1996. Courtship behavior of male *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in captivity. Florida Entomologist 79, 130-143.
- Boller, E. F. 1985. *Rhagoletis cerasi* and *Ceratitis capitata*. 135-144, In: E. G. King & N. C. Leppla (eds.), Handbook of Insect Rearing, Vol. II. Elsevier, New York
- Dyck VA, Hendrichs JP, Robinson AS, eds. 2005. The sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management, 427-451, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Eberhard W, 2000. Sexual behavior and sexual selection in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Dacinae: Ceratitidini). In Aluja M, Norrbom A (eds.), Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior. CRC Press, Boca Raton, Fla, 457–489.
- Hendrichs J, Hendrichs MA, 1990. Mediterranean fruit-fly (Diptera, Tephritidae) in nature- location and diel pattern of feeding and other activities on fruiting and nonfruiting hosts and nonhosts. Annals of the Entomological Society of America 83, 632-641.
- Kaspi R, Taylor PW, Yuval B, 2000. Diet and size influence sexual advertisement and copulatory success of males in Mediterranean fruit fly leks. Ecological Entomology 25, 279-284.
- Katsoyannos B.I., Koulousis N.A., Papadopoulos N.T., 1997. Response of *Ceratitis capitata* to citrus chemicals under semi-natural conditions. Entomologia Experimentalis et Applicata 82: 181-188.
- Kouloussis N.A., B. I. Katsoyannos, N. T. Papadopoulos, C. S. Ioannou<sup>1</sup> & I. V. Iliadis, 2013. Enhanced mating competitiveness of *Ceratitis capitata* males following exposure to citrus compounds. J. Appl. Entomol. 137, 30-38

Muller, 1950. Radiation damage to genetic material. American Scientist 38, 33-59, 126.

Papadopoulos N.T., Katsoyannos B.I., Koulousis N.A., Hendrichs J. 2001a. Effect of orange peel substances on mating competitiveness of male *Ceratitis capitata*. Entomologia Experimentalis et Applicata 99, 253-261.

Papadopoulos Nikos T., Dimitrios P. Papachristos and Charalambos Ioannou, 2015. Citrus fruits and the Mediterranean fruit fly. Proc. XII<sup>th</sup> Intl. Citrus Congress, 1009-1018.

Papadopoulos Nikos T., Todd E. Shelly, Nuri Niyazi, and Eric Jang, 2006. Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J Insect Behav, Vol. 19, No. 3, 403-418.

Prokopy RJ, Hendrichs J, 1979. Mating-behavior of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) on a field-caged host tree. Annals of the Entomological Society of America 72, 642-648.

Rocha LS, Mascarenhas RO, Perondini ALP, Selivon D, 2005. Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Neotropical Entomology 34, 1013-1015.

Sarakatsanou A., A. D. Diamantidis, S. A. Papanastasiou, K. Bourtzis & N. T. Papadopoulos, 2011. Effects of *Wolbachia* on fitness of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). J. Appl. Entomol. 135, 554-563.

Shelly T.E., Whittier T.S., Kaneshiro K.Y., 1993. Behavioral responses of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) to trimedlure baits: can leks be created artificially? Annals of the Entomological Society of America 86, 341-351.

Sivinski J, Jeronimo F, Holler T, 2000. Development of aerial releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Hymenoptera : Braconidae), a parasitoid that attacks the Mediterranean

fruit fly, *Ceratitis capitata* (Weidemann) (Diptera: Tephritidae), in the Guatemalan highlands. *Biocontrol Science and Technology* 10, 15-25.

Stella A. Papanastasiou, Eleftheria-Maria D. Bali, Charalampos S. Ioannou , Dimitrios P. Papachristos , Kostas D. Zarpas , Nikos T. Papadopoulos, 2017. Toxic and hormetic-like effects of three components of citrus essential oils on adult Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*). *PLoS ONE* 12(5): e0177837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177837>

Weeks A., Turelli M., Harcombe W., Reynolds T., Hoffmann A., 2007. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *Plos Biology* 5, 997-1005.

Werren J.H., 1997. Biology of *Wolbachia*, 587-604.

Whittier T.S., Kaneshiro K.Y., Prescott L.D., 1992. Mating-behavior of Mediterranean fruit flies (Diptera, Tephritidae) in a natural environment. *Annals of the Entomological Society of America* 85, 214-218.

Yen J.H., Barr A.R., 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature* 232, 657-658.

Yuval B., Blay S., Kaspi R., 1996. Sperm transfer and storage in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 89, 486- 492.

Yuval B., Hendrichs J., 2000. Behavior of flies in the genus *Ceratitis* (Dacinae: Ceratitidini) Sexual behavior and sexual selection in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Dacinae: Ceratitidini). In Aluja M, Norrbom A (eds.), *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 429–457.

Zabalou S., Riegler M., Theodorakopoulou M., Stauffer C., Savakis C., Bourtzis K., 2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 15042-15045.

Zabalou S., Apostolaki A., Livadaras I., Franz G., Robinson A.S., Savakis C., Bourtzis K., 2009. Incompatible insect technique: Incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. Entomologia Experimentalis et Applicata 132, 232-240.

Ιωάννου Χ.Σ. , 2014. Μελέτη φυτικών ερεθισμάτων που επηρεάζουν την ωοτοκία και άλλες βιολογικές παραμέτρους της Μύγας της Μεσογείου, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Κυρίτσης Γ.Α. , 2016. Επίδραση ενδο-συμβιωτικών μικροοργανισμών στη συμπεριφορά και βιολογία της Μύγας της Μεσογείου(Diptera: Tephritidae). Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Παπαδόπουλος Ν.Θ., Δ.Γ. Σταυρίδης , Κ.Δ. Ζάρπας και Α.Δ. Διαμαντίδης, 2012. Η μύγα της Μεσογείου στην Ελλάδα: υφιστάμενη κατάσταση και σχεδιασμός της αντιμετώπισής της.

Παπαναστασίου Σ.Α. , 2014. Επίδραση της ηλικίας και άλλων παραγόντων στη συμπεριφορά της Μύγας της Μεσογείου, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Τζανακάκης Μ.Ε , 1995. «Εντομολογία». University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Τζανακάκης ΜΕ, Κατσόγιαννος ΒΙ, 2003. Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου Εκδόσεις ΑγροΤύπος, Αθήνα.